

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19591790
 研究課題名（和文） 麻酔薬の神経保護メカニズム：MAP キナーゼとカルシウム動態からの解明
 研究課題名（英文） The mechanism of neuroprotective effect of anesthetics related to MAP kinases and calcium
 研究代表者
 澁田 達史（ SHIBUTA SATOSHI ）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：20324767

研究成果の概要（和文）：

低酸素に対するフリーラジカルスカベンジャー、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワン（EDA）の神経保護作用に関して、温度の差異による影響を調べた。常温（37 度）および高温（39 度）では EDA により有為に細胞生存率が上昇した。一方で低温下低酸素暴露群では、対照群の細胞生存率が常温群に比べ有為に高く、EDA を投与しても細胞生存率に影響はみられなかった。以上の結果より低酸素暴露に対しては低温による神経保護作用が EDA 投与の神経保護効果を上回った。一方で、常温及び高温下では EDA により細胞生存率は有為に上昇したことにより、神経保護作用が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Edaravone, a free radical scavenger, has been shown to be neuroprotective in *in vivo* and *in vitro* conditions. However, the impact of small temperature variations on the molecule remains unknown. Our study found that the temperature of the CNS is a potential factor in determining whether edaravone confers a potent neuroprotective effect when applied during prolonged hypoxic insults.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：①MAP キナーゼ②カルシウム③麻酔薬④一酸化窒素⑤神経保護作用⑥温度

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々の研究グループはラット初代培養脳神経細胞を用いて薬物による脳虚血モデルであるグルタミン酸、

N-methyl-D-aspartate (NMDA) 及び一酸化窒素 (NO) 供与体による薬物細胞傷害モデル (Shibuta's model) 及び無酸素無グルコース暴露による細胞傷害モデ

ルを作成し、低温療法、静脈麻酔薬（チオペンタールナトリウム、ケタミン、プロポフォール）及び一酸化窒素合成阻害薬（L-NAME及びONO-1714）による脳神経保護作用を検討した（Shibuta S et al, Br J Pharmacol 1998 124; 804-819. , Varathan, and Shibuta, J Neurosci Res 2002 68: 352-362. Varathan S and Shibuta S J Neurosci Res. 2003 72(5):613-21, Shibuta S et al, Br J Anaesth 2006 97 (4): 517-24）。脳内では脳虚血や低酸素症により興奮性アミノ酸が過剰に放出される。この興奮性アミノ酸のうち、グルタミン酸はNMDA、AMPAレセプター等を刺激し、それと共にカルシウムイオンが細胞内に流入し一酸化窒素合成酵素が刺激され大量のNOが産生される。NOは生理的な範囲では、脳内のセカンドメッセンジャーとして働くが、大量に放出された場合はスーパーオキシドなどと反応しペロキシニトライトを産生する。そしてこれらのフリーラジカルはミトコンドリアの電子伝達鎖やTCA回路、DNAなどに不可逆的なダメージを与え、脳神経細胞を損傷し細胞死を惹起する。我々の開発した Shibuta's model は個々の神経細胞を培養皿の外側からマーキングすることにより同一の細胞を長期間持続的かつ安価、簡便に観察することが可能とした（Shibuta S et al, J Neurol Sci 2000 174; 9-15）。従って、低酸素状態や脳虚血による神経細胞の傷害の程度、及びそれらに対する低温療法や薬物の保護作用の判定が個々の神経細胞のレベルで行う事が出来、解析に非常に有用であると高く評価されている。また、細胞の傷害性並びにそれに対する薬物や低温療法の効果についての報告は *in vivo* で行われている報告が多く、その場合、脳神経細胞は循環、呼吸、代謝、内分泌機能などの影響を受けるため、純粹に温度や薬物が神経細胞へ与える影響を検討する事は困難である。従って本モデルでの脳神経細胞傷害時における薬物、及び低温療法による神経保護効果の検討は中枢神経レベルでの作用機序の解明や治療方法の改善に新たな知見を与えるものと考えられた。従来、麻酔薬の作用機序に関する研究では麻酔薬がいかに神経伝達物質の輸送や膜タンパク質を興奮性、抑制性イオンチャンネルを通じて調節するかに焦点が

当てられていた。従来の知見によれば麻酔薬は神経細胞の発達、興奮、アポトーシスを制御する細胞内の信号伝達経路にも大きな影響を与えるとされている。この中でも中心となるのはイソフルレンなどの揮発性麻酔薬では細胞内に貯蔵されていたカルシウムイオンの自由化である。中等度濃度（50-200 nM）の細胞内カルシウムイオンの増加はイソフルレン前処置による神経保護作用には不可欠であるという報告がある。イソフルレン作用の結果としての少量から中等度の細胞内カルシウムイオンの増加はBDNFなどの神経栄養因子による神経細胞の作用の際にも見られる状態と似通っており、またこれら両者においてはマイトジェン活性化プロテインキナーゼERK 1/2が重要な役割を果たすという点でも似ている。イソフルレンの前処置によるNMDA-NO関与系においても細胞内カルシウムイオン上昇が関係するという報告がある。しかしながら静脈麻酔薬、NMDA拮抗薬、一酸化窒素合成酵素阻害薬、カルシウム拮抗薬、フリーラジカルスカベンジャー等の薬物の神経保護作用に関してカルシウムイオン依存性伝達系を幅広く調べた研究はなかった。

当時、一酸化窒素供与体を用いて培養脳神経細胞への傷害の程度を検討しているのは我々の研究グループのみであった。また、脳保護作用における低温効果を培養神経細胞を用いて検討している研究は少なく、特に初代培養大脳皮質神経細胞を用いたものは我々の研究グループの報告のみであった。更に形態学的に観察された生存神経細胞機能を電機生理学的及び免疫組織学的検査により質的な評価を行ったという報告は未だに無いと思われる。我々のグループの一連の研究により、静脈麻酔薬チオペンタールナトリウムが優れたフリーラジカルスカベンジャーであるという報告（Shibuta S et al, Br J Pharmacol 1998 124; 804-819.）や低温による神経細胞保護は中等度の低体温が最も優れており、高度の低体温は却って脳神経細胞に大きな傷害を与えるという報告（Varathan S, Shibuta S et al. J Neurosci Res. 15;65(6):583-90 2001）は大きな反響を呼んだ。また、チオペンタールナトリウムと並んで頻用されているプロポフォールにはフリーラジカルスカベンジャーとしての脳神経保護

作用はない (Shibuta S et al. Neuroreport 2001 12: 295-298.) 事や、従来、誘導型一酸化窒素合成酵素に対する特異的な阻害薬とされていたONO-1714による脳神経保護作用の論文 (Shibuta S et al J Neurol Sci. 2003 15;215(1-2):31-6) もそれぞれ欧米の学術誌に掲載された。

2. 研究の目的

上記の研究成果に鑑み我等の研究グループは単独、及び混合投与による静脈麻酔薬、NMDA拮抗薬、一酸化窒素合成酵素阻害薬、カルシウム拮抗薬、フリーラジカルスカベンジャー等の薬物や低温状態が脳神経細胞に直接および影響を明らかにし、脳虚血状態における薬物療法及び低温療法の作用機序を細胞内カルシウムイオンの制御及びミトジェン活性化プロテインキナーゼの点より解明することによりその脳保護作用を明らかにし、さらに生存脳神経細胞を量的のみならず質的に判定する事を目的とした。具体的には静脈麻酔薬をはじめ、NMDA拮抗薬、一酸化窒素合成酵素阻害薬、カルシウム拮抗薬、フリーラジカルスカベンジャー等の薬物や低体温による脳保護効果を薬物による脳虚血モデル (Shibuta's model) および無酸素無グルコースモデルを用いることにより脳神経細胞そのものへの影響を解明し、その作用機序をカルシウムイオン依存性のPyk-2やMEK-ERK 1/2のリン酸エステル化、カルシウムイオン依存性のJNK-cJunやp38経路のリン酸エステル化、アポトーシスのレギュレーター (Akt, GSK, Bad, Forkhead protein, p90 RSK) を通じ様々なミトジェン活性化プロテインキナーゼ (Pyk-2, ERK, MKK-6, JNK) や抗アポトーシス蛋白、またこれらのキナーゼにより制御される下流の転写因子のリン酸化への影響から解明を目的とした。また、従来、虚血モデルやそれに対する薬物、低体温療法の脳保護作用に関しては生化学的検査や形態学的検査といった量的な判断に重きが置かれていたのに対し、今回は生存脳神経細胞の機能評価法として細胞内カルシウムイオン動態の測定をカルシウム蛍光プローブを用いることにより細胞外液よりのカルシウムイオン流入、細胞外刺激によるGタンパク活性化に基づく遊離IP3による小胞体からのカルシウム

放出、微量のカルシウムによる小胞体からのカルシウム放出を測定する事によって判定すると共にホールセル・パッチクランプ法を用いて活動電位を記録し質的な面から、麻酔薬を始めとする薬物や低温療法の脳保護作用を明らかにする事も目的とした。

3. 研究の方法

培養神経細胞を用いた形態学的研究。妊娠16日目のラットより胎児大脳皮質並びに海馬細胞を取り出し、トリプシンを用い酵素処理を行いパストールピペットにて細胞を分離する。分離された細胞は 1×10^6 の濃度にて8%のfetal calf血清、4%ウマ血清を含むダルベッコモディファイイーグル培養液に浮遊させ予めpoly-L-lysineでコーティングされた格子付培養皿に注入する。感染予防のため、ストレプトマイシン及びペニシリンを培養開始直後より3日目まで培養液に加える。また培養開始3から5日目に5-FUを加えグリア細胞の増殖を抑える。これにより純度95%程度の脳神経細胞培養モデルが作成することが可能となる。その後14日目までインキュベーター内に培養細胞を留置する。培養細胞は薬物または無酸素無グルコースによる脳虚血モデル暴露直前に位相差顕微鏡にて観察後写真撮影を行い500から1000迄の神経細胞をカウントする。これまで我々のグループでは大脳皮質神経細胞に対して $30 \mu\text{M}$ のNMDAを24時間暴露し、その直後にトリパンブルー染色を行い同一部位の神経細胞を写真撮影し形態学的に神経細胞の生死を判定したところ89%もの神経細胞がネクローシスを起こす事が確認されている。それに対してNMDA暴露直前に静脈麻酔薬を培養神経細胞に投与した場合、チオペンタールナトリウム ($400 \mu\text{M}$) で55%、プロポフォール ($300 \mu\text{M}$) で3%、ケタミン ($50 \mu\text{M}$) で50%、それぞれ細胞生存率が上昇した。このうち、プロポフォールでは有為な細胞生存率の上昇は認められなかったがチオペンタールナトリウムとケタミンにおいては低濃度では脳神経細胞保護作用が認められなかったものの上記濃度にて我々のモデルに於いて脳神経保護作用を示したと判定された。今回は神経保護作用が認められた静脈麻酔薬及び一酸化窒素合成酵素阻害薬投与と同時にミトジェン活性化プ

ロテインキナーゼ及びその関連シグナルの阻害薬である SP600125 (JNK 阻害薬)、U0126 (MEK1/2 阻害薬)、LY294002 (PDK-1 阻害薬)、U73122 (フォスホリパーゼ C 阻害薬)、カルモジュリン阻害薬、キセトスポンジン C (IP3 受容体拮抗薬) を投与し、細胞生存率に対する影響を形態学的に判定することにより静脈麻酔薬及び一酸化窒素合成酵素阻害薬の神経保護作用においてマイトジェン活性化プロテインキナーゼ及びその関連シグナルがどのように関与しているかを明らかにし、その神経保護作用のメカニズムの解明を目指した。

4. 研究成果

フリーラジカルスカベンジャー、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワンの神経細胞に対する保護作用に関し、長期間暴露された低酸素に対する神経保護作用に関して、温度の差異による影響を調べた。設定温度は軽度低温 (32 度)、常温 (37 度)、高温 (39 度) とした。妊娠 16 日目のウイスターラット胎児大脳皮質神経細胞を 14 日間培養し実験に使用した。各培養神経細胞皿に対し 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワンを 50 nM to 50 μ M の濃度にて投与し、無酸素インキュベーター内に 24 時間留置した後細胞生存率を形態学的方法により判定した。常温下、低酸素暴露群のコントロール群における細胞生存率は $14.7 \pm 1.8\%$ であった。比較的低濃度 (500 nM 以下) の 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワン投与下においては細胞生存率の上昇はみられなかった。一方で、5、50 μ M の各濃度ではそれぞれ $26.7 \pm 4.7\%$ 、 $40.5 \pm 4.7\%$ と有為な細胞生存率の上昇が確認された。高温下低酸素暴露群では、対照群の細胞生存率は $9.1 \pm 2.2\%$ で常温群に比べ生存率が有為に低かった。比較的低濃度 (500 nM 以下) の 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワン投与下においては細胞生存率の上昇はみられず、一方、5、50 μ M の各濃度ではそれぞれ $24.5 \pm 3.3\%$ 、 $39.5 \pm 3.5\%$ と有為に細胞生存率が常温下低酸素暴露群と有為差が消失するまで上昇することが確認された。一方で低温下低酸素暴露群では、対照群の細胞生存率が $63.0 \pm 5.2\%$ と、高温及び常温群に比べ有為に高く、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワンを投与しても細胞生存率に有意な影響はみられなかった。以上の結果より低酸素暴露に対しては低温による神経保護作用が 3-メチル

-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワン投与の神経保護効果を上回った。一方で、常温及び高温下では 3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-ワン投与により細胞生存率は有為に上昇したことにより、神経保護作用が明らかになったと考えられる。また、常温下で静脈麻酔薬チオペンタールナトリウム (400 \cdot M) を投与した場合の細胞生存率は 65% であった。これに in vivo で神経保護作用が認められている MEK1/2 選択的阻害薬 U0126 を付加したところ 50 nM で細胞生存率は 68% と有意ではないが、若干の上昇が見られた。一方で U0126 のアナログである U0124 を付加した場合の細胞生存率は 62% で有為差は見られなかった。従って現時点ではチオペンタールナトリウムの神経保護作用に関して MEK1, MEK2 が関与し、ERK1/2 の活性化の下流にある酵素が影響を及ぼしている可能性は否定できない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① S. Shibuta, S. Varathan, T. Kamibayashi, T. Mashimo. Small temperature variations alter edaravone-induced neuroprotection of cortical cultures exposed to prolonged hypoxic episodes. Br. J. Anaesth. 104: 52-58, 2010 査読あり
- ② Shibata SC, Mizobuchi A, Shibuta S, Mashimo T. Undiagnosed thyrotoxicosis in a pregnant woman with spontaneous renal artery aneurysm rupture. Anesthesia and Analgesia 108(6):1886-8, 2009 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① 山下智範, 大住安紀子, 澁田達史, 眞下節 緊急帝王切開術後に対照的な経過を辿ったもやもや病合併妊娠の2症例 日本臨床麻酔学会誌, 30(6) : 5233 2010.11.3-6 (徳島市)
- ② 澁田達史, 上林卓彦, 眞下節 Small temperature variations alter edaravone-induced neuroprotection of cortical cultures exposed to prolonged hypoxic episodes. 第57回日本麻酔科学会総会 (福岡市) 2010.6.3-5

- ③ 大住安紀子、萩平哲、溝渕敦子、入嵩西毅、澁田達史、真下節 挿管困難症例に対してダブルルーメンチューブを挿管する方法について 第29回日本臨床麻酔学会総会 2009. 9. 17-18 (浜松市)
- ④ 溝渕敦子、柴田晶カール、植田一吉、高階雅紀、真下節、澁田達史 帝王切開時に難治性頻脈に陥り術後甲状腺クリーゼと判明した一症例 日本麻酔科学会 Journal of Anesthesia P2-66-05 2009. 8. 16 (神戸市)
- ⑤ Satoshi Shibuta*, Sriranganathan Varathan Neuroprotective effect of edaravone on cortical cultures exposed to prolonged hypoxia in vitro. Society for Neuroscience Abstracts Presentation Number: 834.12 2008. 11. 16-21 (Washington DC)
- ⑥ 澁田達史 チオペンタールナトリウムとケタミン混合投与における脳保護作用 日本麻酔科学会 Journal of Anesthesia 2007. 5. 30-6. 2 (札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澁田 達史 (SHIBUTA SATOSHI)
大阪大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20324767

(2) 研究分担者

真下 節 (MASHIMO TAKASHI)
大阪大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10110785
上林 卓彦 (KAMIBAYASHI TAKAHIKO)
大阪大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 10273640

(3) 連携研究者

()

研究者番号：